



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI VERONA

DIPARTIMENTO DI MEDICINA

**DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MEDICHE**

**CLINICHE E SPERIMENTALI**

**CICLO XXIII**

**L'ISOPROSTANO PGF<sub>2α</sub> INDUCE  
STRESS DEL RETICOLO ENDOPLASMATICO  
ED APOPTOSI DEI MACROFAGI PRESENTI  
NELLE PLACCHE ATEROSCLEROTICHE CAROTIDEE**

**Dottorando: Dott. Andrea Pasini**

**Tutor: Prof. Luciano Cominacini**

INTRODUZIONE .....	3
SCOPO DELLA TESI .....	10
MATERIALI E METODI .....	11
Selezione delle placche carotidee umane .....	11
Campioni di placca carotidea .....	11
Evidenziazione delle cellule apoptotiche .....	12
Estrazione dell'RNA totale contenuto nelle placche .....	12
Real Time -PCR .....	13
Western Blotting .....	13
Preparazione dell'estratto di placca aterosclerotica (PE) .....	14
Colture cellulari.....	15
Radicali liberi dell'ossigeno (ROS) .....	15
Quantificazione di colesterolo libero e 7-keto-colesterolo .....	15
Quantificazione di LysoPC ed PGF <sub>2α</sub> .....	16
Analisi statistica.....	17
RISULTATI .....	18
DISCUSSIONE.....	22
CONCLUSIONI .....	25
TABELLE E FIGURE.....	26
BIBLIOGRAFIA .....	42

## INTRODUZIONE

L'aterosclerosi è una malattia cronica che decorre asintomatica per molti decenni (1) e nella sua progressione può determinare eventi acuti come l'infarto miocardico acuto (IMA), la morte improvvisa e l'ictus ischemico (1). E' importante sottolineare che tali eventi clinici acuti sono spesso indipendenti dal grado di stenosi: infatti circa il 70% degli IMA avviene in coronarie con stenosi <50% e solamente una piccola percentuale (attorno al 15%) in coronarie con una stenosi superiore al 70% (2). Accade spesso, infatti, che siano proprio le lesioni asintomatiche e non stenotiche ad essere fatali, mentre le lesioni stenotiche con lume ridotto, piccolo core centrale e spesso cappuccio fibroso si manifestano clinicamente come angina da sforzo (1).

Sebbene i meccanismi fisiopatologici dell'aterosclerosi non siano ancora completamente chiariti, è ormai largamente riconosciuto che endotelio, infiammazione e stress ossidativo giochino un ruolo chiave in tutte le fasi dell'aterosclerosi e sono meccanismi comuni attraverso i quali agiscono i tradizionali fattori di rischio (3,4). La placca aterosclerotica è infatti caratterizzata dall'attivazione delle cellule endoteliali, dall'infiltrazione di cellule derivate dal sangue circolante (soprattutto monociti e linfociti), e dalla migrazione di cellule muscolari lisce dalla media all'intima (5,6). La lesione più precoce della malattia aterosclerotica, la stria lipidica, è rappresentata da un accumulo sottointimale costituito in piccola parte da cellule muscolari lisce e lipidi extracellulari ed in gran parte da foam cells, cioè macrofagi che hanno internalizzato enormi quantità di lipoproteine a bassa densità ossidate (oxLDL) (7). I macrofagi derivano da monociti circolanti i quali, dopo aver aderito all'endotelio tramite l'espressione di molecole di adesione, sono migrati nell'intima. Nello spazio sottoendoteliale i macrofagi attivati rilasciano citochine pro-infiammatorie, in particolare IL-1 e TNF- $\alpha$ , e specie reattive dell'ossigeno (ROS) che concorrono al danno ossidativo (4). Le oxLDL inoltre alimentano ulteriormente la risposta infiammatoria locale che porta al reclutamento di

altri leucociti attraverso l'espressione delle molecole di adesione (4,8). Le placche aterosclerotiche, inizialmente formate da un core lipidico ricoperto da un cappuccio fibroso, negli stadi iniziali sono localizzate nell'intima; successivamente tendono a protrudere nel lume del vaso interessando la circonferenza della parete arteriosa (9). La progressione dell'aterosclerosi porta alla formazione di placche complesse, ad elevato rischio di rottura, le cosiddette placche instabili che sono caratterizzate da un cappuccio fibroso sottile, infiltrazione di macrofagi, grande core lipidico, indipendentemente dal grado di stenosi (3,9).

Nelle placche in fase avanzata la morte dei macrofagi e delle cellule muscolari lisce avviene attraverso l'apoptosi e la necrosi (10). Recenti studi suggeriscono come l'apoptosi sia significativamente aumentata nei punti di rottura della placca nei pazienti con sindrome coronarica acuta e nelle placche instabili confrontate con le placche stabili (11,12). Al contrario della necrosi che è una morte cellulare determinata da eventi "acuti", l'apoptosi è un processo di morte programmata ordinato e geneticamente regolato, che richiede consumo di ATP ed è essenziale per il normale sviluppo ed omeostasi dei tessuti adulti (13). Le cellule apoptotiche subiscono delle modificazioni morfologiche individuabili mediante microscopia elettronica che iniziano con la contrazione della membrana cellulare, la condensazione del citoplasma e della cromatina con frammentazione del DNA, l'esternalizzazione della fosfatidilserina (segnale "eat me") e la formazione di corpi apoptotici che vengono rimossi rapidamente dal tessuto senza indurre alcuna risposta infiammatoria (13,14). In condizioni fisiologiche, le cellule apoptotiche sono rapidamente riconosciute ed internalizzate da macrofagi specializzati (fagociti o efferociti) attraverso un processo definito fagocitosi o efferocitosi (15). Nell'aterosclerosi in fase iniziale la rimozione delle cellule apoptotiche è molto efficiente e vantaggiosa (15), in quanto una rapida clearance porta ad una soppressione della risposta proinfiammatoria con conseguente riduzione della componente cellulare

delle placche e delle dimensioni della lesione stessa (11). Nelle placche in fase avanzata, invece, le cellule apoptotiche non vengono efficientemente rimosse dagli efferociti, si accumulano e vanno incontro a morte cellulare (11). Questo processo che è definito postapoptosi o necrosi secondaria, promuove il rilascio di “detriti” proinfiammatori, che determinano l'aumento delle dimensioni del core lipidico e quindi l'instabilità della placca aterosclerotica (11). E' stato suggerito in modelli animali che l'espansione del core lipidico sia la conseguenza di un'accelerata apoptosi macrofagica accoppiata ad una clearance fagocitica difettiva, un processo definito efferocitosi difettiva (15,16). Poiché in condizioni fisiologiche le cellule apoptotiche vengono rapidamente rimosse, l'evidenza di cellule apoptotiche in un tessuto è considerata indice di efferocitosi difettiva (11,17). Il meccanismo dell'efferocitosi non è ancora oggi completamente noto, anche se recenti evidenze in modelli animali suggeriscono come l'evento iniziale sia il riconoscimento di segnali “eat me” (18), caratterizzati dall'esposizione della fosfatidilserina sulle membrane delle cellule apoptotiche permettendo l'internalizzazione e la rimozione delle cellule apoptotiche da parte dei fagociti (18) .

Nelle lesioni aterosclerotiche, diversi fattori sembrano contribuire al processo di apoptosi dei macrofagi, ed in particolare alcuni di questi sembrano agire attraverso lo stress del reticolo endoplasmatico (ER) (19).

Il reticolo endoplasmatico (ER) è l'organello cellulare in cui vengono sintetizzate le proteine secretorie e di membrana che sono poi ripiegate stericamente (20). Solo le proteine correttamente piegate vengono trasportate al Golgi e dislocate verso altre destinazioni all'interno della cellula o secrete (21-23). Al contrario, le proteine mal ripiegate vengono trattenute in ER e un loro accumulo può costituire una forma di stress cellulare in quanto possono anche aggregarsi in strutture insolubili di ordine superiore, che può essere disordinato, come, per esempio, nel

caso della rodopsina nella retinite pigmentosa autosomica (24), o ordinate, fibrille di amiloide, come nel caso della malattia di Alzheimer o fibrille non-amiloide in caso di deficit di  $\alpha$ -1-antitripsina (25). Il ripiegamento delle proteine nel ER si verifica con l'aiuto di numerosi chaperon molecolari (26) ed enzimi pieghevoli come il BiP/GRP78 chaperon molecolare (Binding Protein/Glucose Regulated Protein 78) che funziona legandosi alle regioni idrofobiche della proteina spiegata o non completamente piegata (26).

Diverse vie di "signalling", note collettivamente come, risposta alla presenza di proteine mal ripiegate (UPR=unfolded protein response), sono presenti in ER per rilevare l'accumulo di tali proteine e quindi attivare una risposta cellulare per mantenere l'omeostasi. In gravi situazioni di ER stress, allorquando i meccanismi di protezione attivati da UPR, non sono sufficienti a ripristinare la normale funzionalità di ER, si può innescare il processo di morte cellulare per apoptosi (27).

La complessa rete dell'UPR attivata da ER stress, è composta da proteine transmembrana come la double-stranded RNA-activated protein kinase-like ER kinase (PERK), l' inositol-requiring kinase 1 (IRE1) e il fattore di attivazione della trascrizione-6 (ATF6) (28). Dopo prolungato o grave stress di ER, l'attivazione PERK attraverso la mediazione del fattore di trascrizione 4 (ATF4), è stato dimostrato indurre C/EBP proteina omologa (CHOP) e conseguentemente i fattori proapoptotici BH3-only (29-31). PERK, oltre ad attivare CHOP (via pro-apoptotica), è stato dimostrato mediare anche una risposta anti-apoptotica attraverso la fosforilazione di NF-E2-related nuclear factors (Nrf2), un fattore di trascrizione in grado di promuovere vari meccanismi di sopravvivenza in risposta ad uno stress ER (32). In assenza di ER stress, l'Nrf2 risulta inattivo a causa del legame con il Keap1 che lo ancora al citoscheletro nel citoplasma della cellula. La fosforilazione del complesso Nrf2-Keap-1 mediata da PERK, comporta la dissociazione e traslocazione di Nrf2 dal citoplasma al nucleo e l'attivazione dei geni protettivi raggruppati nell' "Antioxidant Response Elements" (AREs). Questi comprendono

NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1), glutathione S-transferase  $\gamma$  subunit (GST  $\gamma$  subunit), heme oxygenase 1 (HO-1),  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase (GCLC) (33-35). Infine, Akt1 signaling pathway è un'altra importante via di sopravvivenza attivata durante ER stress. Nei topi knockout l'assenza di Akt $^{-/-}$  (Akt1 $^{-/-}$ ) è stato dimostrato condurre ad aterosclerosi severa ed occlusione delle arterie coronariche (36). L'attivazione di questa via comporta l'inattivazione mediante fosforilazione di caspase3, Bax ed attivazione di I $\kappa$ B $\alpha$  (effetto anti-apoptotico) (36).

L'attivazione del UPR porta a una varietà di risposte cellulari tra cui, l'attenuazione della traduzione ribosomiale per ridurre il carico di sintesi proteica e prevenire l'ulteriore accumulo di proteine spiegate nel ER, l'up-regulation della trascrizione di geni che codificano per ER accompagnatori ed enzimi pieghevoli per aumentare la capacità di ripiegamento del ER e l'up-regulation trascrizionale dei geni che codificano per i componenti della associated ER degradazione (ERAD), un processo che comporta il riconoscimento e la retrotranslocazione delle proteine mal ripiegate dal ER al citoplasma, dove vengono prontamente degradate dal proteasoma (37).

I meccanismi di riparazione cellulare attraverso l'attivazione di UPR, sono di fondamentale importanza per la capacità delle cellule di far fronte alle ingiurie negative sulla funzione ER. In condizioni di grave danno o danno irreversibile, l'attivazione di UPR può portare ad apoptosi, attraverso la mediazione del fattore di trascrizione CHOP (38). Sebbene i meccanismi con cui CHOP attivi la morte cellulare per apoptosi siano ancora in via di definizione, il suo ruolo critico nel mediare l'ER stress è ben consolidato (38). Di particolare significato il suo ruolo proposto nella aterogenesi per l'elevata espressione CHOP nelle lesioni aterosclerotiche avanzate umane tendenti alla rottura (16). Studi *in vitro* in macrofagi e in cellule muscolari lisce vasali hanno dimostrato che la carenza di CHOP o knockdown CHOP siRNA, protegge la cellula dall'apoptosi indotta da molecole come colesterolo libero o il 7-

ketocolesterolo o fosfolipidi ossidati, presenti in alte concentrazioni nella placca ateromasica (16). Prove sperimentali condotte da Thorp et al. (39), in modelli animali, mostravano che le aree necrotiche presenti in ateromi di topi Chop -/- erano sensibilmente ridotte vs controllo e che il calo è stato più forte (circa 40%-50%) di quello che ci si sarebbe aspettato soltanto sulla base di una diminuzione della superficie totale della placca (circa 35%). Pertanto si è ipotizzato che l'apoptosi dei macrofagi rappresenti un importante fattore di allargamento del core necrotico. A sostegno di queste affermazioni è stato analizzato un sottogruppo di topi da ApoE -/- con lesioni identiche di medie dimensioni, dimostrando sostanzialmente che la riduzione della necrosi era maggiore nel sottogruppo Chop-/- / Apoe-/- (39). Questi dati indicano chiaramente che CHOP gioca un ruolo determinante nell'indurre morte per apoptosi. L'apoptosi è una forma importante di morte cellulare, che richiede l'attivazione di caspasi per rimuovere quelle cellule che possono essere inutili o addirittura dannose per l'organismo (15). L'attivazione delle caspasi si verifica solo a valle di una rilevazione di ER stress insormontabile e, tra i sensori UPR, PERK è stato descritto come un fattore tra i più importanti, in quanto attiva ATF4 e CHOP (40). CHOP inoltre può sensibilizzare le cellule all'apoptosi indotta da ER stress, attraverso una down-regulation del fattore linfoma a cellule B-2 (Bcl-2) (40) e una up-regulation di Bim, un membro proapoptotico BH3-only della famiglia Bcl-2 (40).

Nelle placche aterosclerotiche sono presenti numerosi potenziali fonti di stress di ER, come ad esempio lipidi ossidati (41), colesterolo non esterificato (42), oxisteroli (7-keto-colesterolo) (42), isoprostani (derivati ossidati dell'ac. arachidonico, in particolare  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ) (43) e reactive oxygen species (ROS) (18). Fra i lipidi ossidati, numerose evidenze indicano un ruolo fondamentale dei fosfolipidi ossidati nella malattia aterosclerotica e nella mediazione dei processi infiammatori all'interno della lesione (41). I fosfolipidi ossidati (ossidazione dell'acido grasso insaturo in posizione 2) che si possono formare sia all'interno delle LDL che nelle membrane



cellulari) comprendono numerose specie bioattive ad elevato potenziale proinfiammatorio e possono contribuire alla progressione e destabilizzazione della placca (44,45). Al riguardo un possibile ruolo dell'enzima fosfolipasi  $A_2$  associata alle lipoproteine (Lp-PLA<sub>2</sub>) nello sviluppo e progressione dell'aterosclerosi è stato suggerito da vari autori, in quanto i livelli circolanti di questo enzima sono considerati predittori di malattia cardiovascolare (46-48). Lp-PLA<sub>2</sub> a differenza di altre fosfolipasi  $A_2$ , è un enzima calcio indipendente ed è l'unico in grado di idrolizzare l'acido grasso in posizione-2 dei fosfolipidi ossidati (49). Lp-PLA<sub>2</sub> circola prevalentemente legato alle particelle di LDL (50) ma viene sintetizzata anche da cellule infiammatorie all'interno della placca aterosclerotica (50). Il suo ruolo proaterogeno potrebbe derivare dalla sua capacità di generare due importanti mediatori pro-infiammatori, quali la lisofosfatidilcolina (lysoPC) (fosfolipide privato dell'acido grasso in posizione 2) e acidi grassi ossidati non esterificati (oxNEFA) (49) in particolare l'acido arachidonico ossidato da cui possono derivare una miriade di prodotti ossidati con formazione finale di isoprostani (51), prodotti relativamente stabili fra cui in particolare il PGF<sub>2α</sub>.

## SCOPO DELLA TESI

Scopo del presente lavoro è stato quello di:

1. Dimostrare che nelle placche aterosclerotiche carotidee umane, l'attività pro-apoptotica è preponderante nell'area circostante il core necrotico, rispetto alla porzione più periferica della placca stessa
2. che lo stress di ER è particolarmente severo nelle aree attigue il core necrotico versus la porzione più distale della placca.
3. Appurare con test *in vitro*, che l'estratto di porzioni attigue il core necrotico della placca aterosclerotica carotidea umana, è in grado di indurre stress del reticolo endoplasmatico ed apoptosi.
4. Documentare che tra i numerosi composti presenti nell'estratto di placca aterosclerotica, i derivati ossidati dell'ac. arachidonico, in particolare l'isoprostano  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , stimolano la produzione di ROS, inducono ER stress ed apoptosi cellulare.

## **MATERIALI E METODI**

### **Selezione delle placche carotidee umane**

Sono state oggetto di studio 97 placche carotidee provenienti da 107 pazienti sottoposti ad intervento di trombo-endo-aterectomia (TEA) carotidea. Le indicazioni all'intervento chirurgico osservate seguivano le linee guida della SICVE (Società Italiana di Chirurgia Vascolare ed Endovascolare) e precisamente:

- l'endarterectomia carotidea è indicata nella stenosi sintomatica  $\geq 70\%$  NASCET (52,53) e nella stenosi sintomatica compresa fra il 50% ed il 69% NASCET per i pazienti a più alto rischio (ischemia recente, sintomi cerebrali, placca ulcerata, età avanzata, sesso maschile, non diabetici);
- è indicata nella stenosi asintomatica uguale o maggiore del 60% NASCET solo se il rischio perioperatorio (1 mese dall'intervento) di complicanze gravi è almeno inferiore al 3%;
- non è indicata nella stenosi sintomatica inferiore al 50% NASCET.

Sono stati quindi indirizzati alla chirurgia pazienti portatori di stenosi  $> 60\%$  (NASCET od equivalente ECST /AREA) e pazienti  $> 50\%$  (NASCET od equivalente ECST/AREA) solo se sintomatici con placca ulcerata.

### **Campioni di placca carotidea**

Le placche aterosclerotiche sono state classificate istologicamente in accordo con la procedura descritta da Virmani et al (54) e successivamente aggiornata da Sary et al (55). In questo studio è stato preliminarmente scelto di studiare solamente placche con una capsula fibrosa ( $< 200\ \mu\text{m}$ ), marcatamente infiltrata da macrofagi e con un core necrotico sottostante ( $n=17$ ). I campioni di placca carotidea sono stati immediatamente posti in una soluzione stabilizzante RNALater (Qiagen) per preservarne l'integrità. Ogni placca è stata in seguito

esaminata macroscopicamente individuando il punto di massimo inspessimento, core lipidico (C) e di minimo inspessimento, distale o periferico (P), della lesione; da queste due sezioni venivano prelevati i campioni per gli esami istologici, immunoistochimici, biochimici e per l'espressione genica e proteica.

### **Evidenziazione delle cellule apoptotiche**

La presenza di cellule apoptotiche nelle sezioni di placca carotidea umana è stata valutata mediante ApopTag Peroxidase *In Situ* Oligo Ligation (ISOL, Chemicon International) kit, tramite analisi di frammentazione del DNA cellulare. Questa tecnica si basa sulla specificità dell'enzima T4 DNA ligasi in grado di legare in modo covalente le estremità complementari di una coppia di molecole a doppia elica di DNA. Successivamente la rivelazione viene effettuata attraverso la coniugazione streptavidina-perossidasi e l'utilizzo del substrato diaminobenzidina (DAB), visualizzabile in microscopia a campo luminoso. Le cellule, contrastate con methyl green, presentano i nuclei contenenti frammenti di DNA colorati di marrone. Le cellule colorate positivamente erano contate in 10 campi microscopici scelti in modo randomizzato sia a livello di C che di P ed espresse percentualmente per 1000 cellule contate.

### **Estrazione dell'RNA totale contenuto nelle placche**

I segmenti di placca, dopo essere stati immersi in una soluzione di RNAlater, sono stati immediatamente congelati in azoto liquido e conservati a -80°C fino al momento dell'analisi molecolare.

Per l'estrazione dell'RNA i campioni sono stati omogenati tramite dismembratore meccanico, con biglie di acciaio, in soluzione monobasica contenente fenolo e guanidina tiocianato (buffer di lisi QIAzol): è stato poi utilizzato l'RNeasy Mini Kit (Qiagen). In breve, dopo centrifugazione dell'omogenato e aggiunta di cloroformio si sono ottenute 3 fasi distinte.

Solo la fase acquosa che conteneva l' RNA è stata trasferita successivamente nelle colonnine di concentrazione in dotazione al kit, e dopo alcuni lavaggi con etanolo e buffer RPE (Qiagen), l'RNA è stato eluito con acqua RNasi-free mediante centrifugazione per 1' a 14000 rpm.

Una piccola aliquota dell'RNA totale ottenuto (circa 5 ng) è stata sottoposta a controllo qualitativo e quantitativo tramite Agilent 2100 Bioanalyzer dotato di Chip RNA 6000 Nano (piattaforma microfluidica su chip miniaturizzato in vetro). La valutazione qualitativa e quantitativa dei singoli campioni è stata determinata tramite software dedicato.

### **Real Time -PCR**

Le sequenze di RNA sono state retrotrascritte tramite reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) con l'utilizzo di iScript cDNA Synthesis kit (Bio-Rad, Hercules, CA). I livelli di espressione relativa dei geni di interesse (P53, Caspasi3, BAX, Caspase9, BID, CHOP, Bcl2, Xiap, IKB $\alpha$ , PERK, IRE-1, ATF6, NRF2, HMOX-1, GCLC, AKT1, Lp-PLA<sub>2</sub>) sono stati effettuati in triplicato in 25  $\mu$ L usando QuantiTect Primer Assay e QuantiTect SYBR Green PCR kit (Qiagen) con MyiQ Single-Color-Real Time PCR Detection System (Biorad, CA). I cicli di amplificazione prevedevano 15 minuti a 95°C, 40 cicli a 94°C per 15 secondi e 55°C per 30 secondi seguiti da 72°C per 30 secondi, infine 55°C per 20 secondi. Come normalizzatore è stato usato il primer QuantiTect Hs\_ACTB (Qiagen). I dati di espressione genica sono stati analizzati automaticamente da un software dedicato.

### **Western Blotting**

L'estratto cellulare totale da cellule e tessuti è stato ottenuto mediante l'utilizzo del Nuclear Extract Kit (Active Motif). Dopo quantificazione, le proteine sono state separate mediante elettroforesi in gel di poliacrilamide e quindi trasferite su membrana di nitrocellulosa. La

membrana è stata sottoposta a blocking con 5% Non Fat Dry Milk in soluzione Tween 20 TBS ed immersa over night in una soluzione a 4°C contenente uno i seguenti anticorpi primari: p53 (pAb 240, 1:1000, ab26, Abcam Ltd, Cambridge, UK), Caspase3 (1:500, AAS-103, Assay Designs Inc, Ann Arbor, MI), BAX (1:1000, AAS-040, Assay Designs Inc, Ann Arbor, MI), Caspase9 (1:1000, ab2014, Abcam Ltd, Cambridge, UK), BID (Y8, 1:1000, ab32060, Abcam Ltd, Cambridge, UK), CHOP (1-5 µg/ml, ab23439, Abcam Ltd, Cambridge, UK), Bcl2 (1:2000, AAS-070, Assay Designs Inc, Ann Arbor, MI), XIAP (2 µg/ml, ab21278, Abcam Ltd, Cambridge, UK), Ikbα (1/10000, ab32518, Abcam Ltd, Cambridge, UK), PERK (1:500, ab79483, Abcam Ltd, Cambridge, UK), IRE-1 (1µg/ml, ab37073, Abcam Ltd, Cambridge, UK), ATF6 (1µg/ml, ab37149, Abcam Ltd, Cambridge, UK), NRF2 (1/1000, ab31163, Abcam Ltd, Cambridge, UK), HMOX-1 (1/2000, ab13243, Abcam Ltd, Cambridge, UK), GCLC (ab53179, Abcam Ltd, Cambridge, UK), AKT1 (ab8932, Abcam Ltd, Cambridge, UK), TNFRSF-9 (1/2000, ab78174, Abcam Ltd, Cambridge, UK), Lp-PLA<sub>2</sub> (160603, Cayman Chemical, USA) and anti-β-actin (Santa Cruz Biotechnology). Le proteine sono state rivelate con i corrispettivi anticorpi secondari coniugati a perossidasi in chemiluminescenza. La densità delle bande è stata quantificata con Versadoc imaging (Bio-Rad).

### **Preparazione dell'estratto di placca aterosclerotica (PE)**

All'interno della lesione aterosclerotica, una volta individuata la zona di maggior inspessimento e necrosi, (core necrotico), mediante bisturi sono stati prelevati porzioni della zona immediatamente attigua a C e a P. Il materiale asportato è stato dapprima asciugato sotto N<sub>2</sub>, pesato, congelato in azoto liquido e successivamente polverizzato mediante dismembratore con biglie di acciaio. La polvere così ottenuta è stata sottoposta ad estrazione con 1,5 ml di acqua/metanolo 1:1 per ogni 100 mg di tessuto di partenza, portata poi a secco sotto N<sub>2</sub>, ricostituito con

100 µl di acqua/metanolo per ogni 100 mg di tessuto di partenza ed infine utilizzato come agonista per gli studi *in vitro*.

### **Colture cellulari**

Per gli esperimenti *in vitro*, sono state utilizzate cellule in linea continua monocyte-like THP-1, in RPMI 1640, 10% siero fetale di vitello (FCS), 2 mM glutamina, 100 U/mL penicillina e 0,1 mg/mL streptomicina, ed incubate a 37°C in atmosfera umidificata 100% e 5% CO<sub>2</sub>. Prima degli esperimenti, le cellule sono state poste in piastre da 24 pozzetti in RPMI senza FCS per 2 h e successivamente in RPMI con FCS 1%.

### **Radicali liberi dell'ossigeno (ROS)**

La produzione dei ROS da parte delle cellule è stata valutata mediante citofluorimetria a flusso, utilizzando il dicloro-diidro-fluoresceina-diacetato (DCF-DA). Per l'analisi citofluorimetrica sono state poste in piastre da 6 pozzetti circa  $2 \times 10^6$  cellule in RPMI per 2 ore, successivamente pre-caricate con DCF-DA per 30' ed infine incubate con PE 40 µL/ml medium per ulteriori 30 minuti. Dopo 2 lavaggi in PBS 1% BSA, le cellule sono state immediatamente sottoposte a citofluorimetria.

### **Quantificazione di colesterolo libero e 7-keto-colesterolo**

La quantificazione di colesterolo libero (FC) ed il suo derivato ossidato 7-ketocolesterolo (7-keto) è stata ottenuta mediante derivatizzazione e separazione gascromatografica (GC-FID). In breve, il campione tessutale da analizzare è stato asciugato sotto flusso d'azoto, pesato, congelato in N<sub>2</sub> liquido e successivamente polverizzato mediante dismembratore. La polvere così ottenuta è stata sottoposta ad estrazione con 1,5 ml di una miscela esano/acetato etile/acqua 5 : 2,5 : 2,5 ogni 100 mg di tessuto di partenza. Dopo centrifugazione a 1500 g per 10', il sovranatante è stato portato a secco sotto N<sub>2</sub> e ripreso con 100 µl di derivatizzante bis-

Trimetilsilil- trifluoroacetamide (BSTFA). La reazione di derivatizzazione è stata ottenuta incubando la miscela di razione a 80 °C per 20'. Il campione derivatizzato dopo essere stato portato a secco, è stato ripreso con 100 µl di esametildisilazano (HMDS). Una aliquota veniva iniettata, con modalità split 5:1, nel gascromatografo Agilent 6850 GC-FID. Per la separazione si è utilizzato la colonna ULTRA2 (25m x 0,2 mm i.d.) J&W Scientific, con flusso 1,4ml/min e gradiente di eluizione 220-280 °C a 25°C/min. Tempo di ritenzione di colesterolo libero 9.3min, 7-keto-colesterolo 12.8min.

### **Quantificazione di LysoPC ed PGF<sub>2α</sub>**

La quantificazione di lisofosfatidilcolina (LysoPC) e del derivato dell'acido arachidonico ossidato 8-iso-prostaglandin-like (PGF<sub>2α</sub>) sono state ottenute mediante HPLC e spettrometria di massa a trappola ionica (Agilent 1100 series, LC-MS-ION TRAP; colonna cromatografia Waters Spherisorb C<sub>8</sub> 4,6x250 mm, sorgente ionizzazione Electrospray Ionization). In breve, il campione tessutale dopo essere stato asciugato in N<sub>2</sub>, pesato e congelato in azoto liquido e stato polverizzato mediante dismembratore meccanico. La polvere così ottenuta è stata sottoposta ad estrazione con 2,5 ml di una miscela cloroformio/metanolo/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5M 7 : 2 : 1. Dopo centrifugazione a 1500 g per 10', la fase organica è stata portata a secco sotto flusso N<sub>2</sub> e ripresa con 40 µl di miscela metanolo/cloroformio 4 : 1 per ogni 100 mg di tessuto. Per la quantificazione di lisofosfatidilcolina, 1 µl della miscela metanolo/cloroformio 4:1 veniva iniettato in colonna mediante autocampionatore, fase mobile in isocratica composta da metanolo/acetato ammonio 85:15. Per la quantificazione di PGF<sub>2α</sub> non esterificato, si è utilizzato una colonna Alltech Alltima HP-C<sub>18</sub>-HL (1x150mm), fase mobile 60 % di acetato di ammonio (2 mM) e 40 % acetonitrile/metanolo (95:5).



### **Analisi statistica**

Tutti i dati sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard (SD). Le differenze significative tra i gruppi sono state determinate usando il test t di Student per dati non appaiati. E' stata considerata statisticamente significativa una probabilità pari a  $p < 0.05$ . L'analisi statistica è stata effettuata tramite StatView per Windows (SAS Publishing).

## RISULTATI

### **I macrofagi apoptotici, si localizzano principalmente nelle aree C e cappuccio fibrotico della placca carotidea umana.**

La maggior parte delle cellule apoptotiche presenti nella placca carotidea umana, evidenziate mediante il test ApopTag perossidase, risultavano localizzate principalmente nelle aree più ricche di macrofagi (CD68 positivi) presenti nel cappuccio fibrotico ed in alcune aree adiacenti il core necrotico come mostrato in fig. 1. Le cellule colorate positivamente risultavano significativamente più elevate in C rispetto a P ( $13.8 \pm 1.7\%$  versus  $2.1 \pm 0.8\%$  x1000 cellule contate) ( $p < 0.01$ ).

### **Aree adiacenti a C mostrano una maggiore espressione genica pro-apoptotica vs le aree periferiche della placca.**

La fig. 2a-b mostrano l'espressione genica (mRNA e proteina) di alcuni dei principali mediatori dell'apoptosi della via estrinseca ed intrinseca. Come si può vedere dai grafici, l'mRNA e le proteine di p53, caspase3, BAX, caspase9 e BID risultano significativamente più espressi nelle aree vicine a C rispetto a P. Significativamente più espresso nelle aree attigue a C vs P, anche l'mRNA e proteina, dell'induttore di apoptosi, CHOP. Non sono risultati significativamente differenti invece, l'espressione genica e proteica di Bcl2 e Xiap, ad attività anti-apoptotica. Significativa invece l'espressione genica e proteica di IKB $\alpha$  (fig. 3a-b).

### **Aree adiacenti a C presentano un significativo incremento dell'espressione genica dei sensori unfolding e survival implicati nel ER stress.**

Come descritto in precedenza, nella placca aterosclerotica sono presenti numerosi fattori in grado di indurre ER stress. Per evitare l'accumulo di proteine mal ripiegate non funzionanti, la cellula è dotata di "sensori di unfolding" e di sopravvivenza o "survival", quali PERK, IRE-1, ATF6, ed

Nrf2, HMOX-1, GCLC, AKT1 rispettivamente. Le figure 4 a e b mostrano come l'espressione genica e proteica di questi geni sia significativamente aumentata nelle aree che attorniano C e nel cappuccio fibrotico vs P.

**Le placche aterosclerotiche ed il PE contengono numerose molecole in grado di indurre ER stress ed apoptosi.**

Nella fig. 5 sono indicate le concentrazioni di alcuni dei principali derivati dei fosfolipidi ossidati ed altre molecole biologicamente attive, presenti nella placca aterosclerotica. Dopo estrazione di porzioni di placca (cappuccio e porzioni attigue a C ed a P), LysoPC, PGF<sub>2α</sub>, il colesterolo libero e il suo derivato ossidato 7-keto-colesterolo, sono risultati rispettivamente 296 %, 236 %, 614 % e 666 % più concentrati negli estratti provenienti da C rispetto a quelli derivati da P.

**Il PE è in grado di aumentare l'espressione genica dei fattori correlati con l'apoptosi ed ER stress.**

L'incubazione delle cellule THP-1 con PE per 24 h, ha provocato un incremento significativo dell'espressione genica (mRNA e proteine) di p53, caspase3, BAX, BID e CHOP come mostrato in fig. 6a-b (vs cellule non stimulate). Significativa anche l'espressione (mRNA e proteina) vs cellule basali anche dei fattori anti-apoptotici XIAP ed IκBα; non significativo invece, l'incremento rispetto al basale, dell'inibitore fisiologico di BID e BAX, Bcl2 (fig. 7a-b).

Il PE ha dimostrato di aumentare significativamente anche l'espressione genica (mRNA e proteina) dei sensori di ER stress (PERK, IRE-1, ATF6) e survival (Nrf2, HMOX-1, GCLC, AKT1) (fig. 8a-b) (vs cellule non stimulate), come già evidenziato con l'RT-PCR e western blotting in frammenti *ex vivo* nei campioni di placche aterosclerotiche carotidee umane.

### **Concentrazione di LysoPC, PGF<sub>2α</sub>, colesterolo libero e 7ketocolesterolo nel PE**

In figura 9a esempio di spettro di massa *Total Ion* (50-700 *m/z*), del PE, nell'intervallo di ritenzione dei composti isoprostanoici. In ordinata l'intensità di segnale generato dagli ioni nel medesimo intervallo di ritenzione (*intens* x10<sup>5</sup> riquadro "1x"; *intens* x 10<sup>6</sup> riquadro "20x"). In figura 9b concentrazioni molari di LysoPC, PGF<sub>2α</sub>, colesterolo libero e 7-ketocolesterolo contenuti nella soluzione acqua:metanolo 1:1 (PE) utilizzato per gli stimoli.

### **Aumentata espressione genica della Lp-PLA<sub>2</sub> nella placca aterosclerotica e in cellule THP-1 stimulate *in vitro* con PE e PGF<sub>2α</sub>.**

L'mRNA e la proteina dell'enzima Lp-PLA<sub>2</sub>, sono risultati significativamente più espressi nelle aree che circondano C e il cappuccio fibrotico vs P delle placche carotidee, come evidenziato nella fig. 10a. Test *in vitro* con monociti-like THP-1 prestimolati con PE per 24 h, mostrano un significativo incremento dell'espressione genica (mRNA e proteina) di Lp-PLA<sub>2</sub> rispetto alle cellule di controllo, come evidenziato in figura 10b. Anche il PGF<sub>2α</sub>, principale derivato dell'ac. arachidonico ossidato, incrementa l'espressione genica) della Lp-PLA<sub>2</sub> (fig. 10c).

### **Schematizzazione azione Lp-PLA<sub>2</sub> su fosfolipide ossidato (oxPAPC)**

In figura. 11a schematizzazione del processo catalitico dell'enzima Lp-PLA<sub>2</sub> sul fosfolipide ossidato oxPAPC (palmitoil-arachidonoil fosfatidilcolina ossidata). Da notare come il rapporto stechiometrico oxPAPC:LysoPC sia teoricamente 1:1. Al contrario l'ac. arachidonico, lisato dalla posizione 2 del fosfolipide, può subire differenti ossidazioni radicaliche generando 4 principali famiglie di isomeri: il PGF<sub>2α</sub> è uno degli isomeri della famiglia 8-iso.

### **Il $\text{PGF}_{2\alpha}$ incrementa l'espressione genica dei fattori correlati con l'apoptosi ed ER stress.**

L'incubazione del  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (15  $\mu\text{mol/L}$  finale) per 24 h con i monociti-like THP-1 portava ad un incremento significativo dell'espressione genica (mRNA e proteine) di p53, caspase3, BAX, BID, caspase9 e CHOP come mostrato in fig. 12 a e b. Significativamente espressi (mRNA e proteina) versus cellule basali, anche XIAP ed I $\kappa$ B $\alpha$ . Non significativo invece, l'incremento del Bcl2 (fig.13 a-b).

Il  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , analogamente al PE, ha mostrato un incremento significativo dell'espressione genica dei sensori di ER stress (PERK, IRE-1, ATF6) e survival (Nrf2, HMOX-1, GCLC, AKT1) (fig.14a-b), analogamente a quanto già evidenziato nelle lesioni ateromatose avanzate.

### **Il PE e il $\text{PGF}_{2\alpha}$ stimolano i ROS**

Le cellule THP-1 incubate per 30' con 20  $\mu\text{l}$  PE/ml medium ed analizzate mediante citofluorimetria a flusso, hanno mostrato un incremento significativo dei ROS di oltre il 105 % vs basale. In modo analogo, sono state analizzate le risposte di stimolazione con LysoPC e  $\text{PGF}_{2\alpha}$  che mostravano un incremento significativo del segnale di circa il 12% e del 45 % rispetto alle cellule non stimulate rispettivamente (fig. 15).

## DISCUSSIONE

I risultati di questo studio dimostrano che cellule apoptotiche di derivazione macrofagica sono presenti nell' area circostante il core necrotico piuttosto che nelle zone periferiche di placche carotidee umane. Tali risultati sono in accordo con studi precedenti nei quali era stato dimostrato che l' apoptosi macrofagica è presente in tutte le fasi di sviluppo della placca aterosclerotica con prevalenza, tuttavia, nelle lesioni avanzate (56-57). In linea con questi risultati, il nostro studio dimostra anche che le aree adiacenti al core necrotico hanno una maggiore espressione genica e proteica di proteine proapoptotiche rispetto a quelle periferiche della placca. Al contrario l'espressione di proteine antiapoptotiche sono risultate scarsamente rappresentate in entrambe le aree.

Nel nostro studio si dimostra anche che l'aumentata presenza di cellule apoptotiche e di attivazione genica di proteine pro-apoptotiche nei dintroni del core necrotico andava di pari passo con un marcato aumento dell'espressione dei marcatori di ER stress ed UPR. Anche se i nostri dati non dimostrano una relazione causa/effetto fra ER stress ed apoptosi, essi fortemente suggeriscono che il significativo aumento dei sensori unfolding e survival possano giocare un ruolo nell'induzione dell'apoptosi macrofagica. La nostra ipotesi è in linea con i risultati di studi pubblicati recentemente che hanno dimostrato, da una parte che l'ER stress induceva l'apoptosi attraverso una sovraespressione di CHOP, caspase 9 e 12 (58) dall' altra che topi knockout per CHOP mostravano normale sviluppo, ma meno apoptosi in risposta a ER stress (42, 59). Altre prove sperimentali in modelli animali, condotte da Thorp et al. (39), hanno evidenziato che aree necrotiche presenti in ateromi di topi Chop -/- erano sensibilmente ridotte rispetto ai controlli e che il calo era maggiore (circa 40%-50%) di quello che ci si sarebbe aspettato soltanto sulla base di una diminuzione della superficie totale della placca (circa 35%). Tali autori ipotizzano pertanto che l'apoptosi dei macrofagi

rappresenti un importante fattore di allargamento del core necrotico e suggeriscono un ruolo di CHOP come fattore pro-apoptotico macrofagico e favorente la formazione del core necrotico (60).

In accordo con studi precedenti (61), nel presente lavoro si dimostra inoltre che nelle placche carotidee avanzate umane, l'espressione genica della risposta cellulare anti-apoptotica e di sopravvivenza, che, comprende, risposta UPR mediata da PERK - IRE-1 - ATF6, dalla così detta via "universale" di sopravvivenza AKT-1 e dagli elementi di risposta antiossidante (AREs), era particolarmente vivace nelle aree attigue il core necrotico rispetto porzioni più marginali delle placca.

Nella fase successiva del nostro studio abbiamo provato ad individuare quali sostanze nei dintorni del core necrotico potevano indurre lo stress ER ed innescare l'apoptosi macrofagica. Per fare questo, utilizzando la stessa zona della placca dove abbiamo visto un aumento dello stress ER e dell'apoptosi (area circostante il core necrotico) abbiamo preparato un estratto di placca che potesse essere utilizzato come agonista in esperimenti *in vitro*. Al riguardo PE si è dimostrato in grado di riprodurre *in vitro*, sostanzialmente gli stessi risultati ottenuti in *ex vivo* con le placche aterosclerotiche. In particolare i risultati di questo studio dimostrano che PE induceva una forte espressione dei fattori correlati con l'ER stress e l'apoptosi nelle cellule monocitoidi THP-1. Interessantemente PE induceva nelle stesse cellule anche l'espressione di Lp-PLA<sub>2</sub>. Anche questo dato ottenuto *in vitro* è in linea con quelli da noi ottenuti nei dintorni del core necrotico di placche carotidee umane.

Per quello che riguarda le sostanze di PE che potenzialmente possono indurre ER stress e quindi apoptosi, i nostri dati confermano che nell'estratto erano presenti LysoPC, colesterolo libero e 7-keto colesterolo (62). Per quello che riguarda il 7-Keto, il colesterolo libero, studi *in vitro* avevano dimostrato che tali sostanze erano in grado di indurre la produzione di ROS, ER stress e l'attivazione della UPR e dell'apoptosi in colture di cellule muscolari lisce. Per quello che riguarda il PGF<sub>2α</sub>, solo recentemente Nishibe et al (43) ne hanno dimostrato la presenza in

placche coronariche di pazienti vulnerabili (angina instabile e/o infarto miocardico recente). Al riguardo l'analisi chimica condotta nel nostro laboratorio mediante spettrometria di massa ha confermato la presenza di questo isoprostano nell'area intorno al core necrotico (*ex-vivo*) e nel PE derivante da placche aterosclerotiche carotidee umane. Dei composti derivanti dall'attività della Lp-PLA<sub>2</sub>, l'isoprostano PGF<sub>2α</sub> è risultato avere una concentrazione decisamente più bassa rispetto alla LysoPC. La sua concentrazione era inoltre inferiore anche a quella del colesterolo libero e del 7-keto colesterolo. Come è noto, gli isoprostani rappresentano una famiglia di sostanze prostaglandine-like, formate *in situ* dai fosfolipidi presenti nelle membrane plasmatiche (49). Essi sono generati solo dopo attacco radicalico (63). Il PGF<sub>2α</sub> rappresenta attualmente il più affidabile marker di stress ossidativo *in vivo* e la sua escrezione urinaria è stata proposta come marker di rischio in pazienti affetti da coronaropatia (64).

I risultati di questo studio dimostrano anche che il PGF<sub>2α</sub>, non solo è presente nelle placche aterosclerotiche umane, ma che esso è in grado di indurre ER stress ed indurre la risposta UPR ed attivare la AKT-1 pathway. Inoltre che stimolazioni persistenti (24h) nelle cellule THP-1, attivano il processo apoptotico attraverso la CHOP pathway. Infine, i risultati di questo studio dimostrano che il PGF<sub>2α</sub>, analogamente a quanto ritrovato con il PE, stimola efficacemente la produzione di ROS nelle cellule THP-1 v. Da qui l'ipotesi, che l'incremento dello stress ossidativo secondario all'aumento dei derivati ossidati dell'ac. arachidonico nelle lesioni avanzate, favorisca l'ulteriore radicalizzazione dell'ac. arachidonico contenuto nei fosfolipidi di membrana e nelle LDL e conduca ad un ulteriore incremento dei composti in grado di indurre ER stress / UPR ed infine apoptosi cellulare.



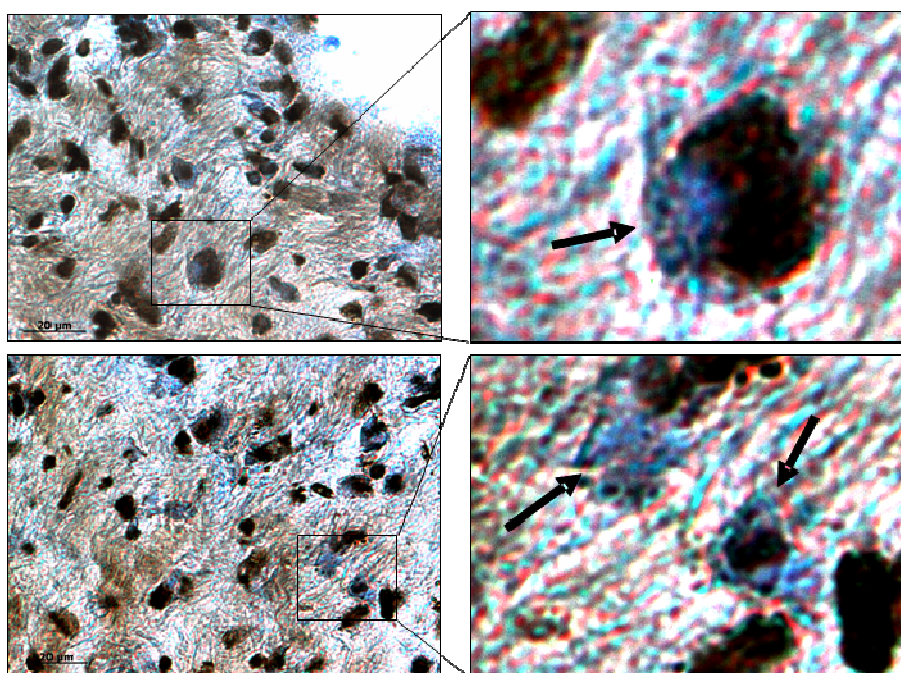
## CONCLUSIONI

Con il presente lavoro viene dimostrato che:

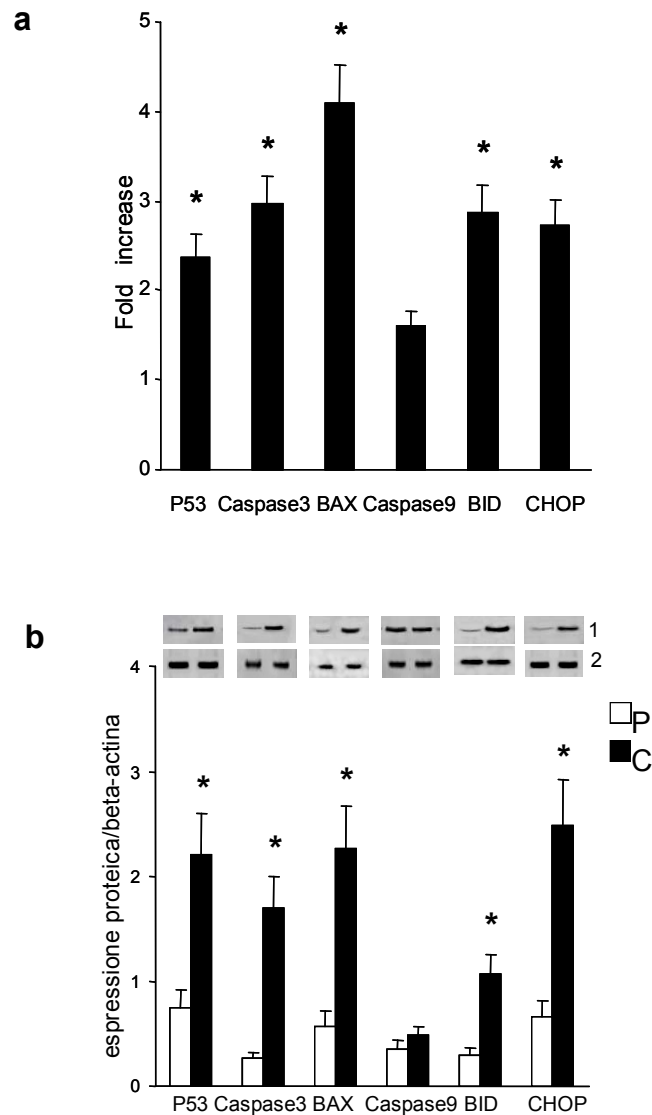
- l'area intorno al core necrotico di placche carotidee umane presenta un'espressione di componenti coinvolti nell'attivazione dell'apoptosi e dell'ER stress /UPR più elevata rispetto le aree periferiche della placca.
- Nell'area intorno al core necrotico di placche carotidee umane sono presenti composti in grado di indurre ER stress ed apoptosi (LysoPC, colesterolo libero, 7-keto colesterolo e  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ).
- L'estratto di placca carotidea PE riproduce *in vitro*, quanto rilevato in *ex vivo* nelle lesioni avanzate umane.
- Tra i derivati dell'ac. arachidonico ossidato contenuti nell'estratto PE, prodotti dall'attività della Lp-PLA<sub>2</sub>, il  $\text{PGF}_{2\alpha}$  stimola potentemente l'ER stress / UPR ed l'apoptosi CHOP mediata.
- Il  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , determina produzione di ROS che a loro volta potrebbero favorire l'ulteriore radicalizzazione dei fosfolipidi di membrana e delle LDL, evento che potrebbe ulteriormente potenziare lo stress ER/UPR e l'apoptosi.

## TABELLE E FIGURE

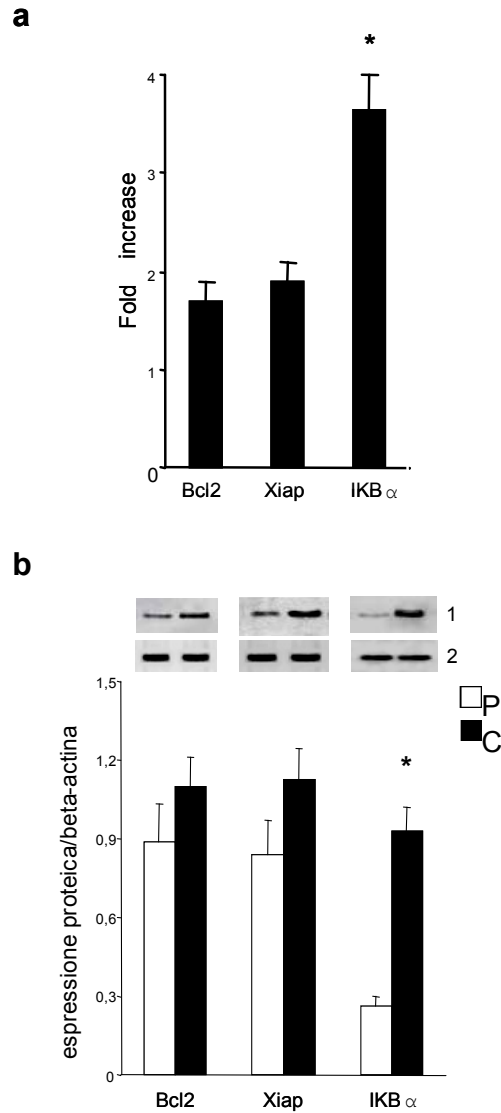
Acronimi e abbreviazioni standard	
<b>AKT1</b>	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
<b>ARE</b>	antioxidant response elements
<b>ATF6</b>	fattore attivazione trascrizione 6
<b>BAX</b>	Bcl2 associated X protein
<b>Bcl-2</b>	B-cell lymphoma 2
<b>BID</b>	BH3 interacting domain death agonist
<b>C</b>	core
<b>Caspase</b>	cysteine protease
<b>CHOP</b>	C/EBP proteina omologa
<b>ER</b>	reticolo endoplasmatico
<b>FC</b>	colesterolo libero
<b>IKB<math>\alpha</math></b>	NF-kappa-B inhibitor alpha
<b>IRE1</b>	inositol-requiring kinase 1
<b>HMOX-1</b>	Heme oxygenase
<b>GCLC</b>	glutamate-cystein ligase
<b>LysoPC</b>	lisofosfatidilcolina
<b>Lp-PLA<sub>2</sub></b>	fosfolipasi A <sub>2</sub> lipoproteica
<b>NRF2</b>	NF-E2-related nuclear factors
<b>Ox-NEFA</b>	acidi grassi non esterificati ossidati
<b>P</b>	periphery
<b>p53</b>	phosphoprotein p53
<b>PE</b>	plaque extraction
<b>PERK</b>	protein kinase-like ER kinase
<b>PGF<sub>2<math>\alpha</math></sub></b>	isoprostaglandin-like F <sub>2<math>\alpha</math></sub>
<b>ROS</b>	specie reattive ossigeno
<b>UPR</b>	unfold protein response
<b>XIAP</b>	X linked inhibitor of apoptosis protein



**Fig. 1.** Riscontro di cellule apoptotiche in aree attigue al core necrotico in placca ateroclerotica carotidea evidenziate mediante ApopTag Peroxidase In Situ Oligoligation (ISOL). Nuclei contenenti DNA frammentato in marrone come indicato dalle frecce.

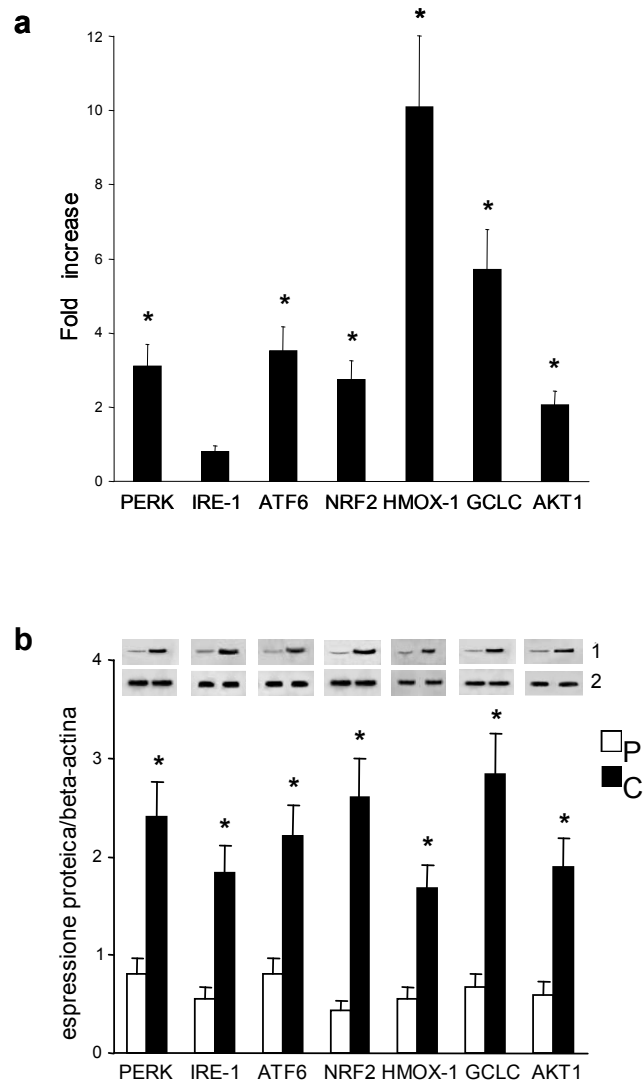


**Fig. 2.** (a) Espressione mRNA di alcuni fattori pro-apoptotici presenti in aree attigue il core necrotico (C) in placca aterosclerotica carotidea avanzata vs aree più periferiche della stessa placca (P). (b) Western blotting delle relative proteine pro-apoptotiche (1), beta-actina (2) e rapporto densitometrico proteina/beta-actina presenti in C vs P. Aumento significativo dell'espressione genica e proteica in C di P53, Caspase3, BAX, Caspase9, BID e CHOP vs P. \*  $p < 0.05$  vs P



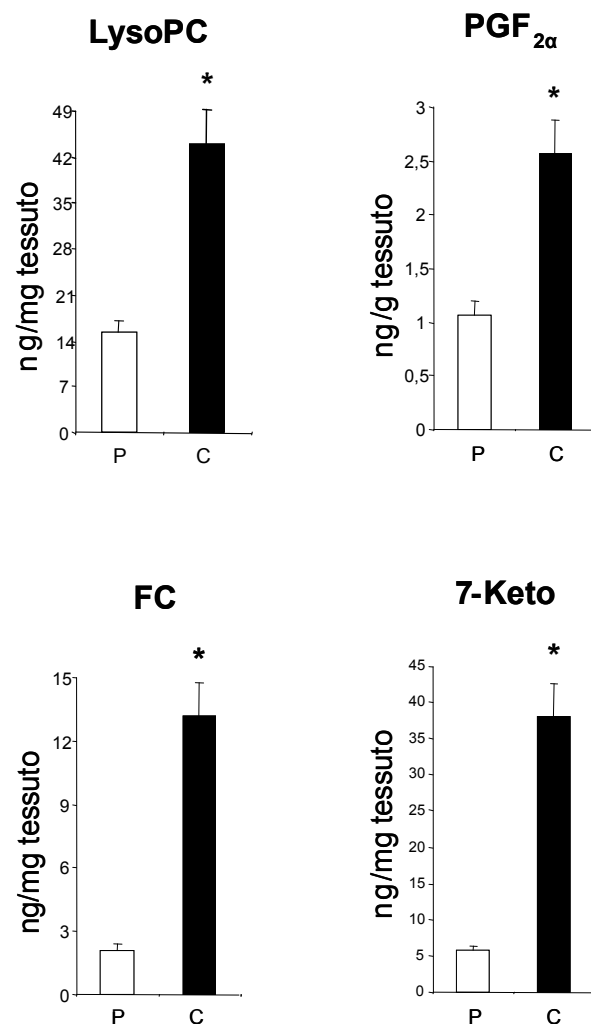
**Fig. 3.** (a) Espressione genica mRNA di fattori anti-apoptotici presenti in aree attigue al core necrotico (C) di una placca aterosclerotica carotidea avanzata vs porzioni più periferiche della stessa placca (P). (b) Western blotting delle relative proteine anti-apoptotiche (1), beta-actina (2) e ratio densitometrico proteina/beta-actina presenti in C vs P. Significativo l'aumento dell'espressione genica e proteica in C vs P di IKB $\alpha$ . Non significative le differenze di Bcl2 e Xiap

\*  $p < 0.05$  vs P



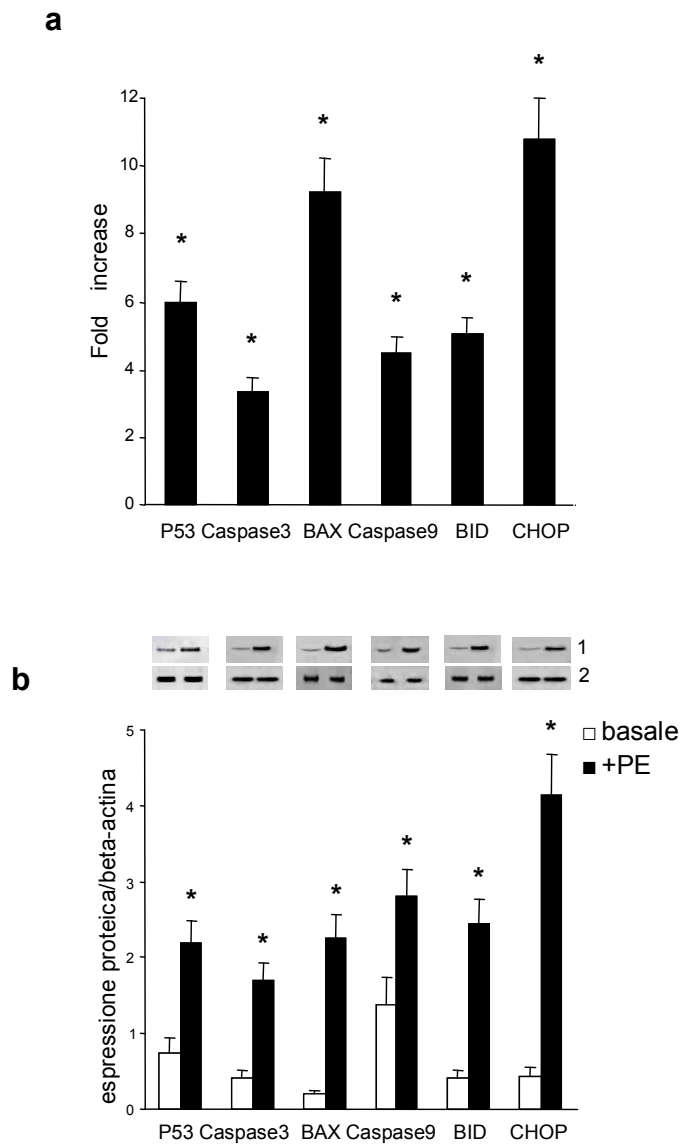
**Fig. 4. (a)** Espressione genica mRNA di alcune proteine sensibili a ER stress e di sopravvivenza presenti in aree attigue il core necrotico (C) di una placca aterosclerotica carotidea avanzata vs porzioni periferiche della stessa placca (P). **(b)** Western blotting delle relative proteine (1), beta-actina (2) e rapporto densitometrico proteina/beta-actina presenti in C vs P. Aumento significativo dell'espressione genica e proteica in C vs P di PERK, IRE-1, ATF6, NRF2, HMOX-1, GCLC e AKT1.

\*  $p < 0.05$  vs P



**Fig. 5.** Determinazione quantitativa mediante LC-ESI-MS e GC-FID di lisofosfatidilcolina (LysoPC), derivato dell'acido arachidonico ossidato PGF<sub>2α</sub>, colesterolo libero (FC) e 7-keto-colesterolo (7-keto) presenti nel core necrotico (C) e nell'area periferica della stessa placca carotidea (P).

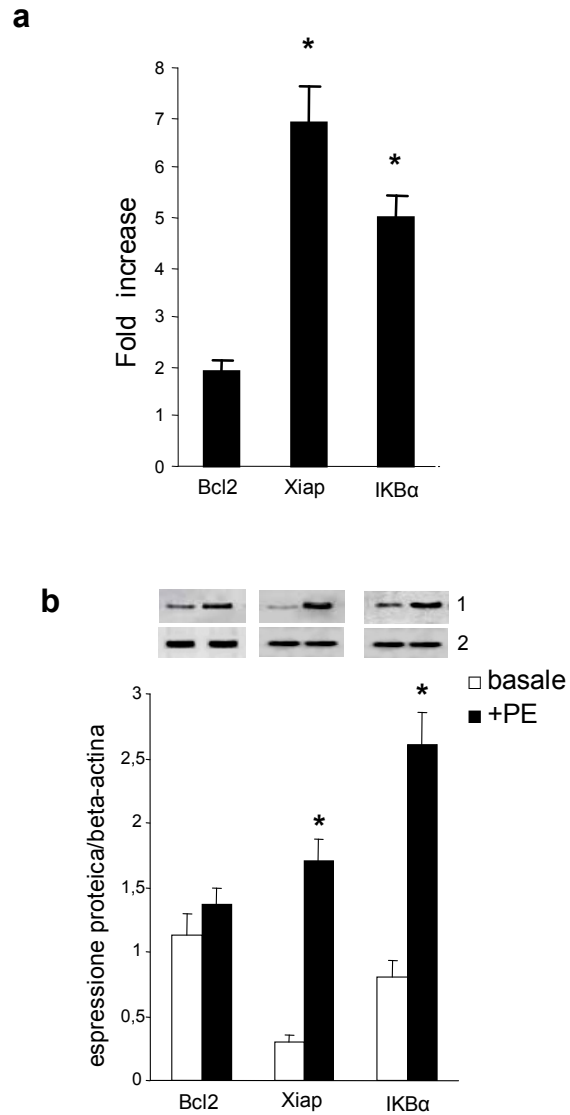
\*  $p < 0.05$  vs P



**Fig. 6.** Espressione genica mRNA (**a**) in cellule THP-1 stimulate per 24 h con estratto di placca (PE) carotidea di alcuni geni pro-apoptotici. Western Blotting (**b**) delle relative proteine (1), beta-actina (2) e ratio densitometrico proteina/beta-actina. Significativo l'aumento dell'espressione genica e proteica di p53, Caspase3, BAX, Caspase9, BID e CHOP presenti nelle cellule stimulate con PE vs cellule basali non stimulate.

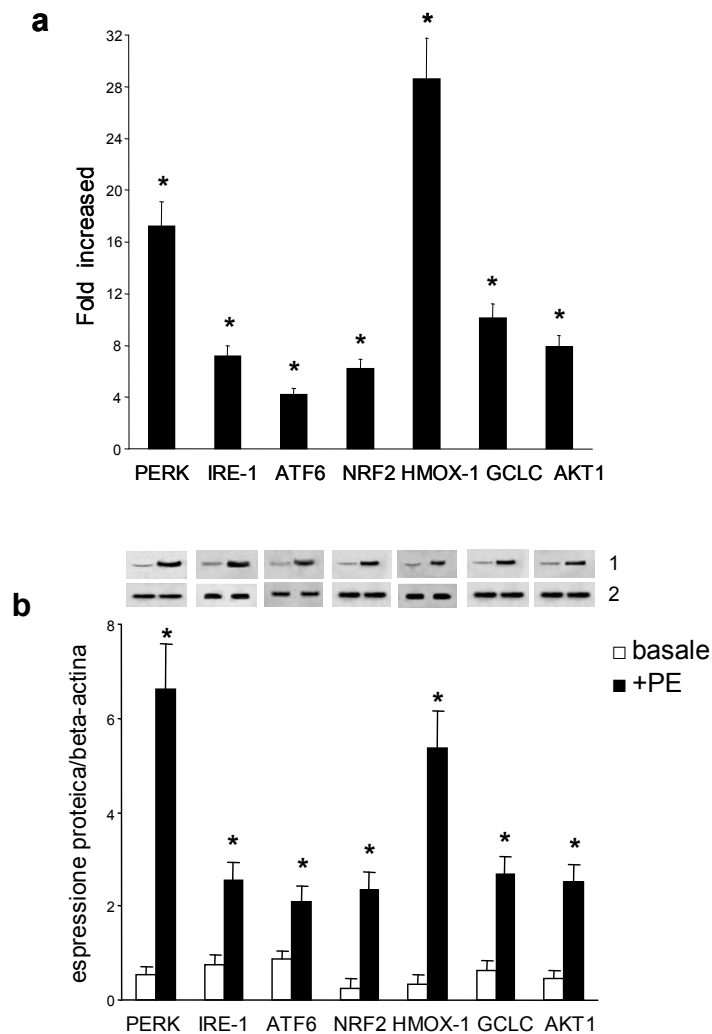
\*  $p < 0.05$  vs basale





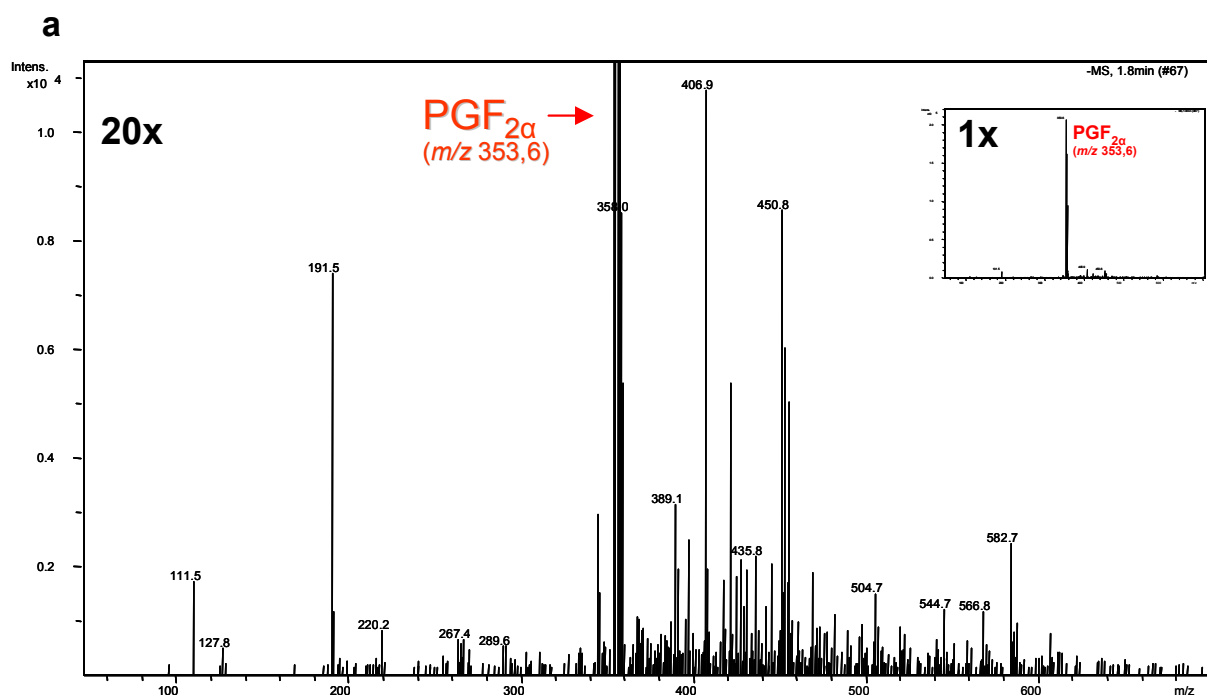
**Fig. 7.** Espressione genica mRNA (**a**) in cellule THP-1 stimulate per 24 h con estratto di placca carotidea (PE) di alcuni geni anti-apoptotici. Western Blotting (**b**) delle relative proteine (1), beta-actina (2) e ratio densitometrico proteina/beta-actina. Significativo l'aumento dell'espressione genica e proteica di Bcl2, Xiap e IKBα nelle cellule stimulate con PE vs cellule basali non stimulate.

\*  $p < 0.05$  vs basale



**Fig. 8.** Espressione genica (**a**) in cellule THP-1 stimulate per 24 h con estratto di placca carotidea (PE) di alcune proteine sensibili a ER stress e di sopravvivenza. Western Blotting (**b**) delle relative proteine (1), beta-actina (2) e ratio densitometrico proteina/beta-actina. Significativo l'aumento dell'espressione genica e proteica di PERK, IRE-1, ATF6, NRF2, HMOX-1, GCLC e AKT1 nelle cellule stimulate con PE vs cellule basali non stimulate.

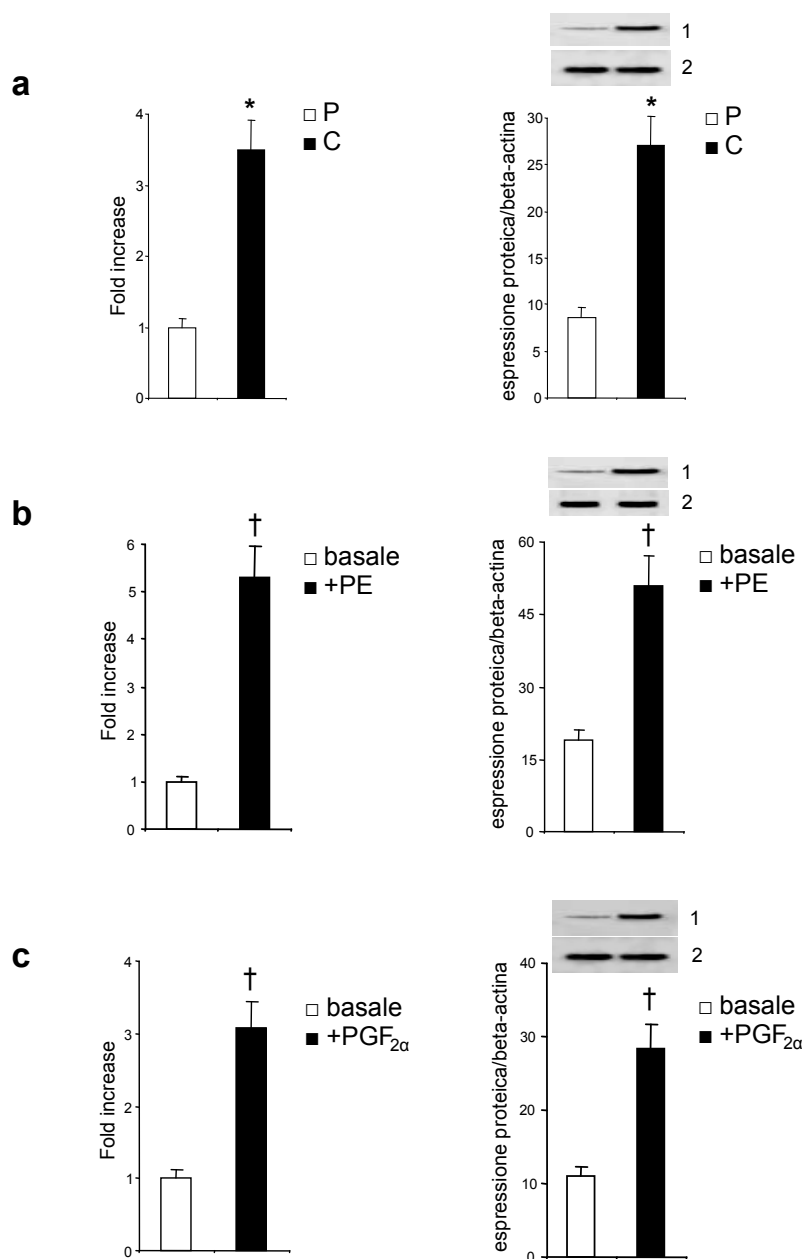
\*  $p < 0.05$  vs basale



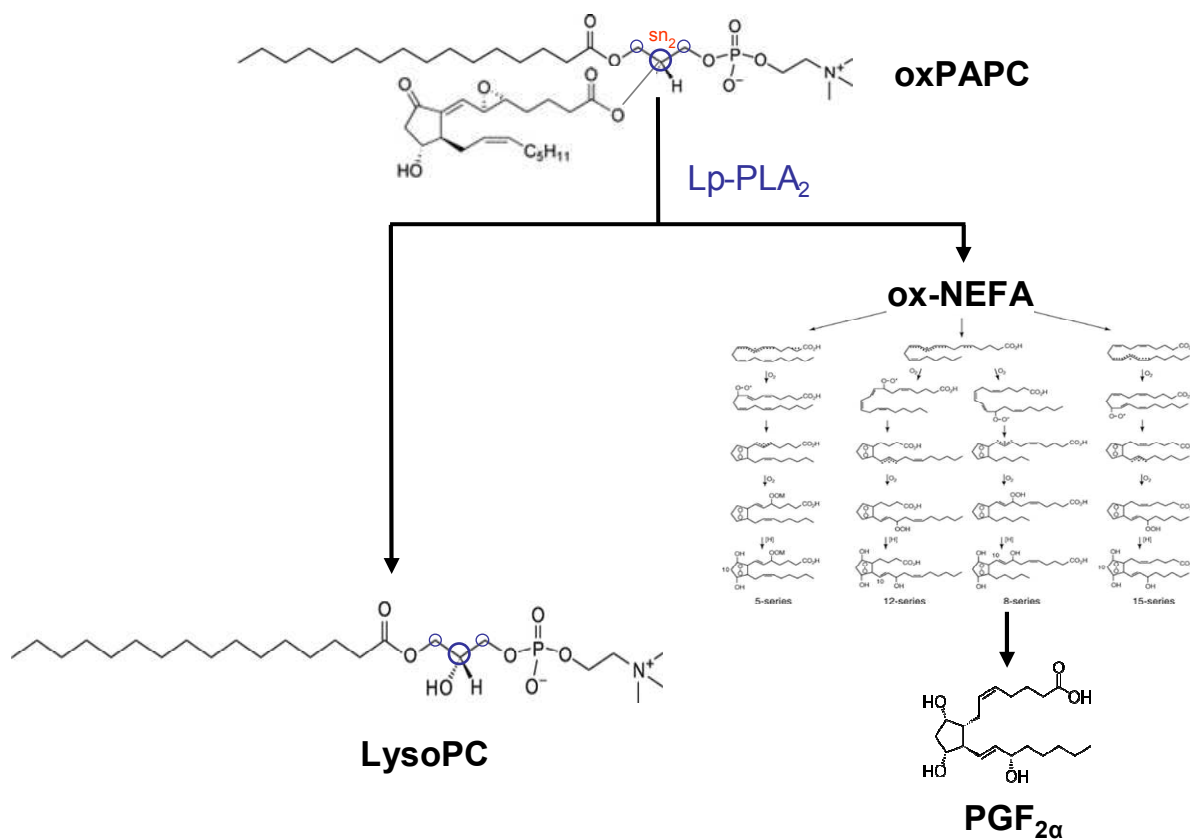
**b**

Compound	concentrazione $\pm$ sd ( $\mu\text{mol/L}$ )
LysoPC	143,8 $\pm$ 98,1
PGF <sub>2α</sub>	0,014.1 $\pm$ 0,006
FC	34,4 $\pm$ 27,5
7-keto	0,089 $\pm$ 0,043

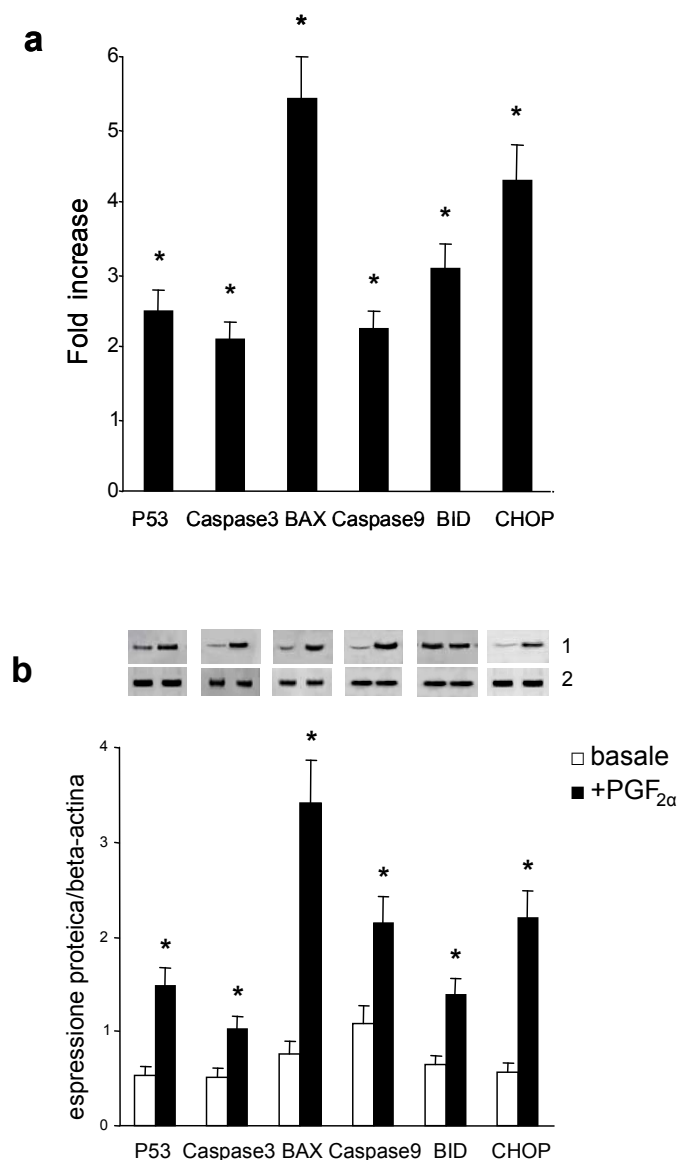
**Fig. 9.** Analisi mediante cromatografia liquida-spettrometria di massa di PE: esempio di spettro totat-ion 50-700  $m/z$  nell'intervallo di ritenzine dei composti isoprostanoici: forte presenza del segnale 353,6 relativo al PGF<sub>2α</sub> (**a**). Determinazione quantitativa mediante LC-ME ed GC-FID, di lisofosfatidilcolina (LysoPC), derivato ossidato dell'acido arachidonico  $m/z$  353,6 (PGF<sub>2α</sub>), colesterolo libero (FC) e 7-keto-colesterolo (7-keto) presenti nell'estratto di core necrotico (PE) utilizzato per i test di stimolazione in vitro con le cellule THP-1. Concentrazioni delle molecole espresse  $\mu\text{mol/L}$  (**b**).



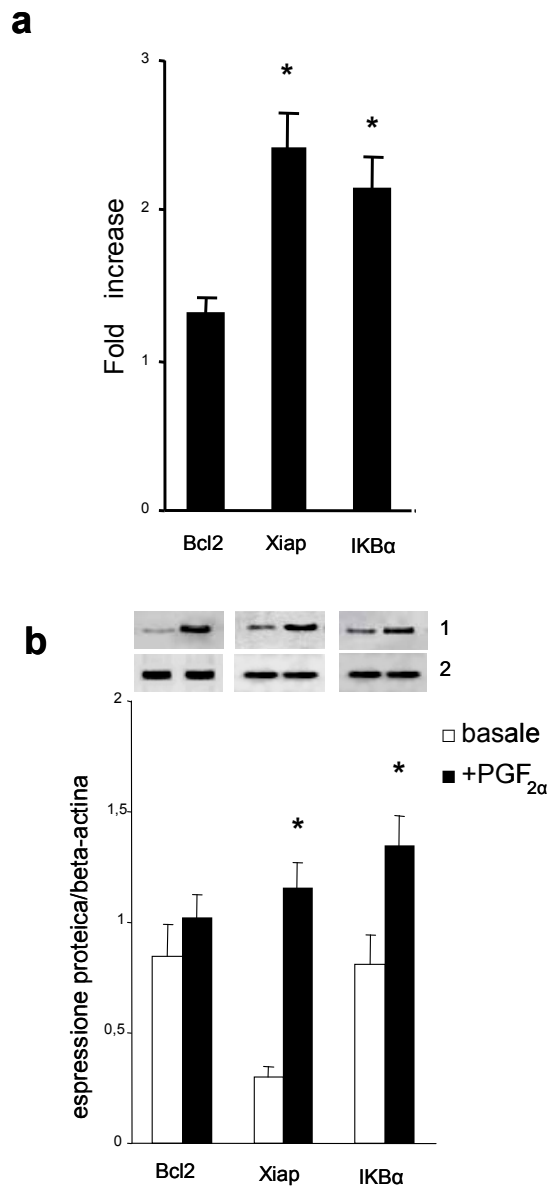
**Fig. 10.** Espressione genica mRNA e proteica (1), beta-actina (2) di Lp-PLA<sub>2</sub> in placca aterosclerotica carotidea presente nel core necrotico (C) vs aree più periferiche della stessa placca (P) (a). Espressione genica mRNA e proteica (1), beta-actina (2) di Lp-PLA<sub>2</sub> in cellule THP-1 stimulate per 24 h con PE (b) e con PGF<sub>2α</sub> (c) vs cellule basali non stimulate. Significativo l'aumento della Lp-PLA<sub>2</sub> nel C vs P. Significativo inoltre l'aumento nelle cellule stimulate con PE e con PGF<sub>2α</sub> vs cellule basali non stimulate.  
 \*  $p < 0.05$  vs P †  $p < 0.05$  vs basale



**Fig. 11.** Schematizzazione dell'azione catalitica della Lp-PLA<sub>2</sub> verso un fosfolipide ossidato (ox-PAPC): rapporto stechiometrico di sintesi oxPAPC:LysoPC 1:1. Contrariamente, l'ossidazione radicalica dell'ac. arachidonico può generare 4 famiglie isomeriche differenti, il PGF<sub>2α</sub> è uno degli isomeri appartenenti alla famiglia 8-iso prostagladin-like.

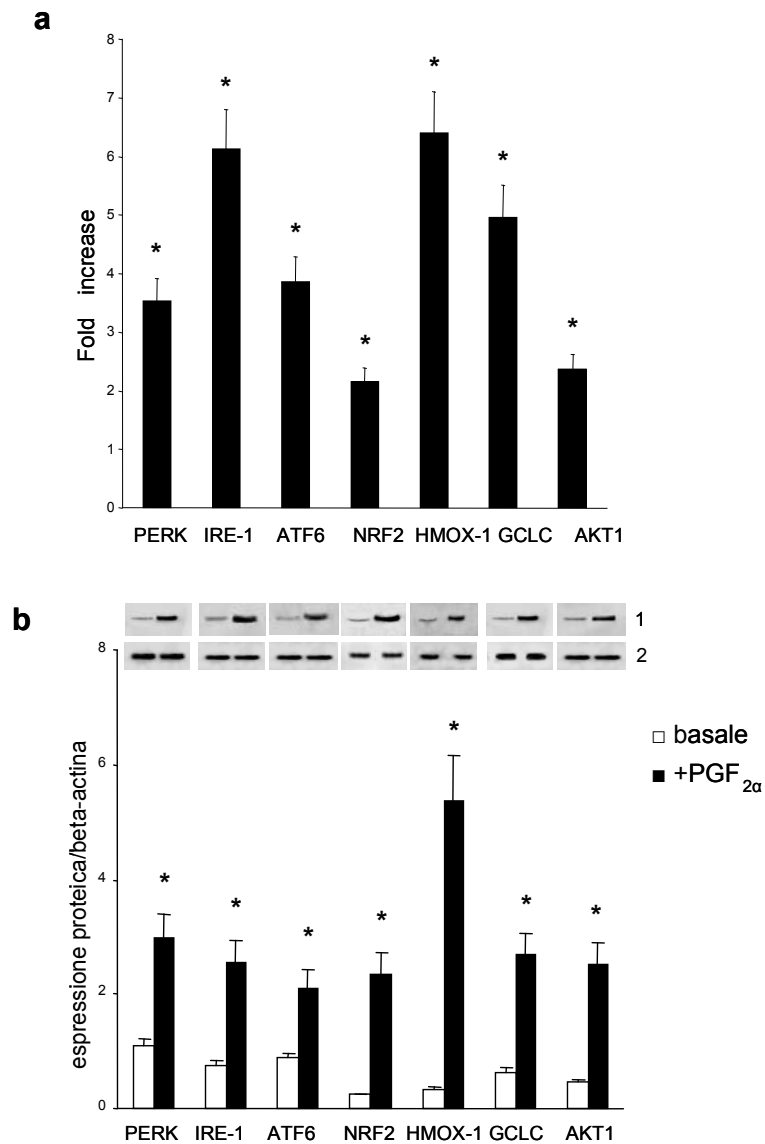


**Fig. 12.** Espressione genica mRNA (**a**) in cellule THP-1 stimulate per 24 h con PGF<sub>2α</sub> di alcuni geni pro-apoptotici. Western Blotting (**b**) delle relative proteine (1), beta-actina (2) e ratio densitometrico proteina/beta-actina. Significativo l'aumento dell'espressione genica e proteica di p53, Caspase3, Bax, Caspase9, BID e CHOP presenti nelle cellule stimulate con PGF<sub>2α</sub> vs cellule basali non stimulate.  
\*  $p < 0.05$  vs basal



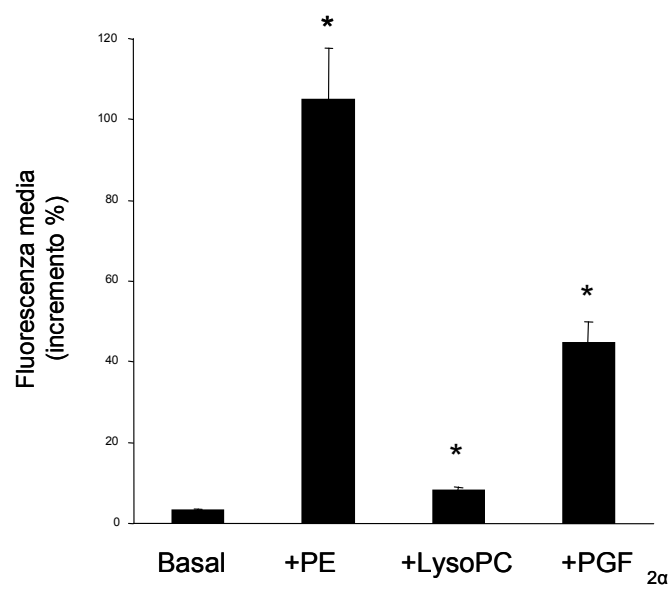
**Fig. 13.** Espressione genica mRNA (**a**) in cellule THP-1 stimulate per 24 h con PGF<sub>2α</sub> di geni anti-apoptotici. Western Blotting (**b**) delle relative proteine (1), beta-actina (2) e ratio densitometrico proteina/beta-actina. Significativo l'aumento dell'espressione genica e proteica di Bcl2, Xiap e IKBa nelle cellule stimulate con PGF<sub>2α</sub> vs cellule non stimulate.

\*  $p < 0.05$  vs basale



**Fig. 14.** Espressione genica mRNA (**a**) in cellule THP-1 stimulate per 24 h con PGF<sub>2α</sub> di alcune proteine sensibili a ER stress e di sopravvivenza. Western Blotting (**b**) delle relative proteine (1), beta-actina (2) e ratio densitometrico proteina/beta-actina. Significativo l'aumento dell'espressione genica e proteica di PERK, IRE-1, ATF6, NRF2, HMOX-1, GCLC e AKT1 nelle cellule stimulate con PGF<sub>2α</sub> vs cellule basali non stimulate.  
\*  $p < 0.05$  vs basale





**Fig. 15.** Determinazione dei ROS mediante citofluorimetria a flusso in cellule THP-1 stimulate con PE, LysoPC e PGF<sub>2α</sub> vs cellule basali non stimulate. Significativo l'aumento della produzione di ROS nelle cellule stimulate con PE, LysoPC e PGF<sub>2α</sub>  
\*  $p < 0.05$  vs basale

## BIBLIOGRAFIA

1. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26:239-57
2. Kavurma MM, Bhindi R, Lowe HC, Chesterman C, Khachigian LM. Vessel wall apoptosis and atherosclerotic plaque instability. *J Thromb Haem Libby P, Theroux P. Pathophysiology of coronary artery disease. Circulation* 2005; 111:3481-3488
3. Falk E, Shah PK, Fuster V. Coronary plaque disruption. *Circulation* 1995; 92:657-671
4. Davies M. Going from immutable to mutable atherosclerotic plaques. *Am J Cardiol* 2001; 88:2F-9F
5. Ross R. Atherogenesis- An inflammatory disease. *NEJM* 1999; 340:115–126
6. Krams R, Cuhlmann S, Foin N, Evans P. Shear stress, inflammation and atherosclerosis. *Artery Res* 2010; 220:305-313
7. Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nature Reviews Immunol* 2006; 6:508-519
8. Kaplan M, Aviram M. Oxidized low density lipoprotein: atherogenic and proinflammatory characteristics during macrophage foam cell formation. An inhibitory role for nutritional antioxidants and serum paraoxonase. *Clinical chemistry and laboratory medicine* 1999; 37:777-787

9. Libby P, Ridker PM. Inflammation and atherothrombosis. *J Am Coll Cardiol* 2006; 48:A33-A46
10. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM. Lessons: from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:1262-1267
11. Mitchinson MJ, Hardwick SJ, Bennett MR. Cell death in atherosclerotic plaques. *Curr Opin Lipidol* 1996; 7:324-9
12. Seimon T, Tabas I. Mechanisms and consequences of macrophage apoptosis in atherosclerosis. *J Lipid Res* 2009; 50:382-387
13. Walsh K, Smith RC, Kim HS. Vascular cell apoptosis in remodeling, restenosis, and plaque rupture. *Circ Res* 2000; 87:184-8
14. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972; 26(4): 239-57
15. Tabas I. Consequences and therapeutic implications of macrophage apoptosis in atherosclerosis. The importance of lesion stage and phagocytic efficiency. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25:2255-2264
16. Schrijvers DM, De Meyer GR, Herman AG, Martinet W. Phagocytosis in atherosclerosis: Molecular mechanisms and implications for plaque progression and stability. *Cardiovasc Res* 2007; 73:470-480
17. Thorp E, Tabas I. Mechanisms and consequences of efferocytosis in advanced atherosclerosis. *J Leukoc Biol*. 2009; 86:1089-95

18. Maderna P, Godson C. Phagocytosis of apoptotic cells and the resolution of inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta* 2003; 141-151
19. Feng B: The endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages. *Nat. Cell. Biol* 2003; 5:781-792
20. Zhou J: Association of multiple cellular stress pathways with accelerated atherosclerosis in hyperhomocysteinemic apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 2004; 110:207-213
21. Ron D, Walter P: Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol* 2007; 8:519-529
22. Kim I, Xu W, Reed JC: Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Drug. Discov* 2008; 7:1013-1030
23. Minamino T, Kitakaze M: ER stress in cardiovascular disease. *J. Mol. Cell. Cardiol* 2010; 48:1105-1110
24. Tabas I: The role of endoplasmic reticulum stress in the progression of atherosclerosis. *Circ Res* 2010; 107:15-18
25. Li Z, Nabel GJ: A new member of the I kappaB protein family, I kappaB epsilon, inhibits RelA (p65)-mediated NF-kappaB transcription. *Mol. Cell. Biol* 1997; 17:6184-6190
26. Dickhout JG, Colgan SM, Austin RC: Increased endoplasmic Reticulum Stress in atherosclerotic plaques associated with acute coronary syndrome. *Circulation* 2007; 116:1214-1216

27. Rasheva V, Domingos P: Cellular response to endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Apoptosis* 2009; 14:996-1007
28. Kaufman RJ: Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev* 1999; 13:1211-1233
29. Rose MD, Misra LM, Vogel JP: Kar2, a karyogamyh gene, is the yeast homolog of the mammalian bip/grp78 gene. *Cell* 1989; 57:1211-1221
30. HP, Ron D: Endoplasmic reiculum stress and the development of diabetes: a review. *Diabetes* 2002; 51:S455-S461
31. Schroder M, Kaufman RJ: The mammalian unfolded protein response. *Annu. Rev. Biochem* 2005; 74:739-789
32. Cullinan SB, Zhang D, Hannink M, Kaufman RJ, Diehl JA: Nrf2 and Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival. *Mol Cell Biol* 2003; 23:7198-7209
33. Venugopal R, Jaiswal AK: Nrf2 and Nrf2 in association with Jun proteins regulate antioxidant response element-mediated espression and coordinated induction of genes encoding detoxifying enzymes. *Oncogene* 1998; 17: 3145-3156
34. He CH, gong P, Hu B et al: Identification of activating transcription factor 4 (ATF4) as an Nrf2-interacting protein. Implication for heme oxygenase-1 gene regulation. *J Biol Chem* 2001; 276: 20858-20865
35. Nguyen T, Sherratt PJ, Nioi P, Yang CS, Pickett CB: Nrf2 controls constitutive and inducible expression of ARE-driven genes through a

dynamic pathway involving nucleocytoplasmic shuttling by Keap1. *J Biol Chem* 2005; 280: 32845-32492

36. Hernando C, Sessa W.C. Loss of Akt1 Leads to Severe Atherosclerosis and Occlusive Coronary Artery Disease *Cell Metabolim* 2007; 6: 446-457

37. Määttänen P, Gehring K, Bergeron JJ, Thomas DY. Protein quality control in the ER: the recognition of misfolded proteins *Cell Dev Biol* 2010; 21(5):500-11

38. Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ.* 2004; 11:381–389

39. Thorp et al. Reduced apoptosis and plaque necrosis in advanced atherosclerotic lesions of Apoe<sup>-/-</sup> and Ldlr<sup>-/-</sup> mice lacking CHOP. *Cell Metabolism* 2009; 9:474-481

40. Toth A, Nickson P. Endoplasmic reticulum stress as a novel therapeutic target in heart diseases *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 2007; 7(3):205-18

41. Furnkranz A, Leitinger N. Photooxidation Generates Biologically Active Phospholipids That Induce Heme Oxygenase-1 in Skin Cells *Curr. Pharm. Des* 2004; 10:915-921

42. Feng B, Yao PM, Tabas I. The endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages *Nat Cell Biol* 2003; 5:781-792

43. Zhou Q, Kummerow FA. An excess concentration of oxysterols in the plasma is cytotoxic to cultured endothelial cells *Atherosclerosis* 2000; 149:191-197
44. Leitinger N. A role for oxidized phospholipids in atherosclerosis *Curr Opin. Lipidol* 2003; 14:421-430
45. Berliner JA, Subbanagounder G, Leitinger N, Watson AD, Vora D. Evidence for a role of phospholipids oxidation products in atherogenesis *Trends Cardiovasc. Med* 2001; 11:142-147
46. Caslake MJ, Packard CJ, Suckling KE, Holmes SD, Chamberlain P, Macphee CH. Lipoprotein-associated phospholipase A<sub>2</sub>, platelet-activating factor acetylhydrolase: a potential new risk for coronary artery disease *Atherosclerosis* 2000; 150:413-419
47. Koenig W, Khuseyinova N, Lowel H, Trischler G, Meisinger C. Lipoprotein –associated phospholipase A<sub>2</sub>, adds to risk prediction of incident coronary events by C-reactive protein in apparently healthy middle aged men from the general population: results from the 14 year follow up of a large cohort from southern Germany *Circulation* 2004; 110:1903-1908
48. Oei HH, Hofman A, Koudstaal PJ, Stijnen T, Breteler MM, Witteman JC. Lipoprotein-associated phospholipase A<sub>2</sub> does not predict mortality or new ischaemic events in acute coronary syndrome patients *Circulation* 2005; 111:570-575
49. Macphee CH: Lipoprotein-associated phospholipase A<sub>2</sub>, platelet-activating factor acetylhydrolase, generates two bioactive products during the oxidation of low density lipoprotein: use of a novel inhibitor. *Biochem* 1999; 338:479-487

50. Davis B: Electrospray ionization mass spectrometry identifies substrates and products of lipoprotein-associated phospholipase A<sub>2</sub> in oxidized human low density lipoprotein. *J. Biol. Chem* 2008; 283:6428-6437
51. Tsimikas S. Oxidative biomarkers in the diagnosis and prognosis of cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 2006 4;98(11A):9P-17P
52. Beneficial effect of carotid endarterectomy in symptomatic patients with high-grade carotid stenosis. North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial Collaborators. *N Engl J Med*. 1991; 325: 445-453
53. Barnett HJ, Taylor DW, Spence JD. Benefit of carotid endarterectomy in patients with symptomatic moderate or severe stenosis. North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial Collaborators. *N Engl J Med*. 1998; 339:1415-1425
54. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000; 20:1262–1275)
55. Stary HC. Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000; 20:1177–1178
56. Kockx, M. M., G. R. De Meyer, J. Muhring, W. Jacob, H. Bult, and A. G. Herman. Apoptosis and related proteins in different stages of human atherosclerotic plaques. *Circulation*. 1998; 97:2307–2315



57. Kockx, M. M., and A. G. Herman. Apoptosis in atherosclerosis: beneficial or detrimental? *Cardiovasc Res*. 2000. 45:736–746
58. Myoishi et al. Increased endoplasmic reticulum stress in atherosclerotic plaques associated with acute coronary syndrome. *Circulation* 2007; 116:1226-33
59. Oyadomari S, Araki E, Mori M. Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in pancreatic  $\beta$ -cells *Apoptosis* 2002; 7:335-345
60. Feng B, Yao PM, Tabas I. The endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages *Nat Cell Biol* 2003; 5:781-792
61. Schroder M. et al. ER stress and the unfolded protein response. *Mutation Research* 2005; 569:29-63
62. Brown AJ, Jessup W. Oxidized LDL and atherosclerosis *Atherosclerosis* 1999; 142:1-28
63. Basus S. Bioactive eicosanoids: role of prostaglandin F(2 $\alpha$ ) and F-isoprostanes in inflammation and oxidative stress related pathology. *Mol Cells* 2010; 30(5):383-91
64. Katayama S. Oxidative stress marker *Nippon Rinsho* 2006 Aug;64 Suppl 6:142-6